

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets

EP 0 943 685 A2

(11)

EP 0 943 685 A2

B3

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:  
22.09.1999 Patentblatt 1999/38

(21) Anmeldenummer: 99101164.4

(22) Anmeldetag: 22.01.1999

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: C12N 15/12, C07K 14/705,  
C07K 16/28, A61K 48/00,  
C12Q 1/68, G01N 33/576,  
G01N 33/68, C12N 5/10

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 11.02.1998 DE 19805351

(71) Anmelder:  
BASF AKTIENGESELLSCHAFT  
67056 Ludwigshafen (DE)

(72) Erfinder:  
• Kröger, Burkhard, Dr.  
67117 Limburgerhof (DE)  
• Otterbach, Bernd, Dr.  
67061 Ludwigshafen (DE)

(54) Neuer G-Protein-gekoppelter Rezeptor aus menschlichem Gehirn

(57) Neuer G-Protein-gekoppelter Rezeptor aus menschlichem Gehirn, das dafür codierendes Gen und seine Verwendung

EP 0 943 685 A2

## Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft einen neuen G-Protein-gekoppelten Rezeptor aus humanem Gehirn, dessen Gene und Verwendung.

[0002] G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stellen eine Superfamilie integraler Membranproteine dar. Familienmitglieder sind Rezeptoren für alle Typen chemischer Botenstoffe, aber auch Sensoren für Licht und Geruch. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kommen in fast allen Organismen vor.

[0003] Die Rezeptoren sind charakterisiert durch eine Aminosäuresequenz mit 7 ausgeprägt hydrophoben Bereichen. Diese stellen höchstwahrscheinlich membranständige Domänen dar und geben der Familie ihren zweiten Namen: 7-Transmembran-Domänen Rezeptoren.

[0004] Die Liganden dieser Rezeptorfamilie sind mit biogenen Aminen (z.B. Adrenalin, Serotonin, Histamin), Peptidhormonen (z.B. Angiotensin, Endothelin, Bradykinin), Neurotransmittern (z.B. NPY, Substanz P, Opioide) und Proteinen (z.B. Chemokine, Thrombin) sehr vielfältig. Alle diese Messenger sind durch Interaktion mit G-Proteinen an der Signalübertragung in das Innere der Zelle beteiligt. Als Effektoren sind bekannt: Adenylatcyclase, Phospholipase C, Phosphodiesterase.

[0005] Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren werden in drei Unterfamilien unterteilt: die Rhodopsin-Unterfamilie, Calcitonin-Unterfamilie und Glutamat/metabotrope-Unterfamilie.

[0006] Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Protein, enthaltend die in SEQ ID NO:2 dargestellte Aminosäuresequenz oder eine daraus durch Substitution, Insertion oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäureresten erhaltene Sequenz, wobei wenigstens noch eine der wesentlichen biologischen Eigenschaften des in SEQ ID NO:2 dargestellten Proteins erhalten bleibt.

[0007] Die wesentliche biologische Eigenschaft ist in der Aktivität als Rezeptor, insbesondere als G-Protein gekoppelter Rezeptor zu sehen.

[0008] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Proteine mit G-Protein gekoppelter Rezeptoraktivität, die ausgehend von der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz durch gezielte Veränderungen herstellbar sind. Beispielsweise können bestimmte Aminosäuren durch solche mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften (Raumerfüllung, Basizität) ersetzt werden. Es können aber auch ein oder mehrere Aminosäuren hinzugefügt oder entfernt werden, oder mehrere dieser Maßnahmen miteinander kombiniert werden. Die solchermaßen gegenüber der SEQ ID NO:2 veränderten Proteine besitzen wenigstens 60 %, bevorzugt wenigstens 75 % Homologie zu SEQ ID NO:2, berechnet nach dem Algorithmus von Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 85, 2444-2448.

[0009] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Nukleinsäuresequenzen, die für die o.g. Proteine codieren, insbesondere solche mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Primärstruktur.

[0010] Die vorliegende cDNA kann durch dem Fachmann geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden in verschiedenen Expressionssystemen zur Expression gebracht werden. Dies sind beispielsweise pro- oder eukaryotische Vektorsysteme, wie SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus; Plasmide; Phagemide, Phagen.

[0011] Dazu wird die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz üblicherweise mit genetischen Regulationselementen wie Transkriptions- und Translationssignalen funktionell verknüpft. Mit den solchermaßen hergestellten rekombinanten Nukleinsäurekonstrukten werden anschließend Wirtsorganismen transformiert.

[0012] Eine bevorzugte Ausführungsform ist die Verknüpfung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit einem Promotor, wobei der Promotor 5' upstream zu liegen kommt. Weitere Regulationssignale wie Terminatoren, Polyadenylierungssignale, Enhancer können in dem Nukleinsäurekonstrukt Anwendung finden.

[0013] Als Wirtszellen sind Bakterien wie *Escherichia coli*, eukaryotische Mikroorganismen wie *Saccharomyces cerevisiae*, höhere eukaryotische Zellen aus Tieren oder Pflanzen, beispielsweise Sf9 oder CHO-Zellen, geeignet.

[0014] Gewünschtenfalls kann das Genprodukt auch in transgenen Organismen wie transgenen Tieren, z.B. Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden.

[0015] Bei der vorliegenden Erfindung handelt es sich um eine cDNA, die für ein neues Mitglied der G-Protein-gekoppelten Rezeptorfamilie kodiert. Sequenzvergleiche zeigen Verwandtschaft mit Endothelinrezeptoren und Endothelinrezeptor-ähnlichen Sequenzen.

[0016] Die vorliegende Nukleotidsequenz wurde ursprünglich in mehreren cDNA-Bibliotheken aus humanem Gehirn und Rückenmark identifiziert. Die Analyse der Verteilung der zugehörigen mRNA in 50 verschiedenen menschlichen Geweben ergab fast ausschließliche Expression im Gehirn.

[0017] Das durch die vorliegende cDNA kodierte Polypeptid läßt sich zweifelsfrei als G-Protein-gekoppelter Rezeptor identifizieren. Die 7 Transmembran-Domänen, das Kennzeichen dieser Proteinfamilie, lassen sich leicht im Hydrophilitäts-Plot (Kyte, J. and R.F. Doolittle, 1982, J. Mol. Biol. 157, 105-132 (1982)) finden. Die größte Verwandtschaft auf Aminosäureebene findet sich mit 52 % Identität zu einem putativen Endothelinrezeptor Typ B-ähnlichen Protein humanen Ursprungs (Genbank Accession Nummer U87460, (FastA-Programm, Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 85, 2444-2448).

[0018] In besonderen Fällen kann das Genprodukt auch in transgenen Tieren, z.B. Mäusen, Schafen oder transgenen

Pflanzen zur Expression gebracht werden. Ebenso ist es möglich, zellfreie Translationssysteme mit der entsprechenden RNA zu programmieren.

[0019] Darüberhinaus kann das Genprodukt auch in Form therapeutisch oder diagnostisch geeigneter Fragmente exprimiert werden. Zur Isolation des rekombinanten Proteins können Vektorsysteme oder Oligonukleotide verwendet werden, die die cDNA um bestimmte Nukleotidsequenzen verlängern und damit für veränderte Polypeptide kodieren, die einer einfacheren Reinigung dienen. Als solche "Tags" sind in der Literatur z.B. Hexa-Histidin-Anker bekannt oder Epitope, die als Antigene verschiedener Antikörper erkannt werden können (beschrieben zum Beispiel in Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor (N.Y.) Press).

[0020] Ausgehend von der Peptidsequenz können synthetische Peptide generiert werden, die als Antigene für die Produktion von Antikörpern eingesetzt werden. Es ist auch möglich, das Polypeptid oder Bruchstücke davon zur Generierung von Antikörpern einzusetzen.

[0021] Die Herstellung von Antikörpern ist eine dem Fachmann geläufige Tätigkeit. Mit Antikörpern sind sowohl polyclonale, monoklonale, humane oder humanisierte Antikörper oder Fragmente davon, single chain Antikörper oder auch synthetische Antikörper gemeint.

[0022] Die vorliegende cDNA bietet außerdem die Voraussetzung, die genomische Sequenz dieses neuen G-Protein-gekoppelten Rezeptors zu klonieren. Darunter fällt auch die dazugehörige regulatorische oder Promotorsequenz, die beispielsweise durch Sequenzierung des 5' upstream Bereiches der vorliegenden cDNA zugänglich wird. Die Sequenzinformation der cDNA ist auch die Grundlage für die Herstellung von antisense Molekülen oder Ribozymen.

[0023] Eine weitere Möglichkeit des Einsatzes der Nukleotidsequenz oder Teilen davon ist die Erzeugung transgener Tiere. Transgene Überexpression oder genetischer Knockout der Sequenzinformation in geeigneten Tiermodellen kann wertvolle weitere Informationen über die (Patho-)Physiologie des neuen G-Protein-gekoppelten Rezeptors.

[0024] In Situationen, in denen ein Mangel an dem beschriebenen Rezeptor (Protein gemäß Anspruch 1) herrscht, können mehrere Methoden zur Substituierung eingesetzt werden. Zum einen kann das Protein, natürlich oder rekombinant direkt, oder durch geeignete Maßnahmen in Form seiner kodierenden Nukleinsäure (DNA oder RNA) appliziert werden. Dazu können sowohl virale, als auch nichtvirale Vehikel zum Einsatz kommen.

[0025] Ein weiterer Weg bietet sich durch die Stimulation des endogenen, körpereigenen Genes durch geeignete Mittel. Auch der turn-over oder die Inaktivierung z.B. durch Rezeptorkinasen können blockiert werden. Schließlich können Agonisten dieses Rezeptors zum Einsatz gelangen.

[0026] In Situationen, in denen überschüssiger Rezeptor vorliegt, können verschiedene Inhibitoren eingesetzt werden. Diese Inhibition kann sowohl durch antisense Moleküle oder Ribozyme, oder Antikörper und Oligonukleotide, als auch durch niedermolekulare Verbindungen erreicht werden. Darüberhinaus kann der Rezeptor auch durch Antagonisten blockiert werden.

[0027] Weiterhin können die cDNA, die genomische DNA, der Promotor, als auch das Polypeptid, sowie Teilfragmente davon in rekombinanter oder nichtrekombinanter Form zur Ausarbeitung eines Testsystems verwendet werden. Dieses Testsystem ist geeignet, die Aktivität des Promotors oder des Proteins in Anwesenheit einer Testsubstanz zu messen. Bevorzugt handelt es sich dabei um einfache Meßmethoden (colorimetrischer, luminometrischer, fluorimetrischer, immunologischer oder radioaktiver Art,) die die schnelle Meßbarkeit einer Vielzahl von Testsubstanzen erlauben. Die beschriebenen Testsysteme erlauben die Bindung oder Agonisierung oder Antagonisierung von Testsubstanzen in Bezug zum neuen Rezeptor zu beschreiben.

[0028] Die Bestimmung von Menge, Aktivität und Verteilung des Rezeptors oder seiner zugrundeliegenden mRNA im menschlichen Körper kann zur Diagnose, Prädisposition und zum Monitoring bei bestimmten Erkrankungen dienen. Desgleichen kann die Sequenz der cDNA sowie der genomischen Sequenz zu Aussagen über genetische Ursachen und Prädispositionen bestimmter Erkrankungen herangezogen werden. Dazu können sowohl DNA/RNA-Proben, sowie unnatürliche DNA/RNA-Proben, als auch Antikörper verschiedenster Art benutzt werden. Dabei dient die beschriebene Nukleotidsequenz oder Teile davon in Form geeigneter Proben zur Aufdeckung von Punktmutationen oder Deletionen/Insertionen.

[0029] Weiterhin kann das beschriebene Protein benutzt werden, um seine natürlichen Liganden zu bestimmen und zu isolieren. So kann der Rezeptor rekombinant in Zellkultur exprimiert und sein Aktivierungszustand z.B. anhand des cAMP-Spiegels abgeleitet werden. Der cAMP-Spiegel läßt sich immunologisch oder mittels Reportertechnologie ermitteln. Damit ergibt sich auch ein diagnostisches Verfahren den Spiegel des Rezeptorliganden in Körperflüssigkeiten oder Geweben zu bestimmen.

[0030] Die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz und das von ihr kodierte Protein können zur Entwicklung von Reagenzien, Agonisten und Antagonisten zur Diagnose und Therapie von chronischen und akuten Erkrankungen des zentralen und peripheren Nervensystems, wie Alzheimer's, Depression, Demenz, Motilitätsstörungen, Hirntumore, Schmerz, Schizophrenie, Angstzustände, Schlaganfall, Schlafstörungen, Apnoen, Husten, Psychosen, Parkinson's, Epilepsie, ALS, Drogenabhängigkeit, Lähmungen, sowie zur Cerebroprotektion und bei Erkrankungen mit nervöser Komponente, wie Obesity, Anorexie, Bulimie eingesetzt werden.

[0031] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis einer Nukle-

insäure nach Anspruch 3 in einer biologischen Probe, das folgende Schritte umfaßt:

a) Inkubation einer biologischen Probe mit einer bekannten Menge an Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 oder einer bekannten Menge an Oligonukleotiden, die als Primer für eine Amplifikation der Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 geeignet sind,

b) Nachweis der Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 durch spezifische Hybridisierung oder PCR-Amplifikation,

c) Vergleich der Menge an hybridisierender Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 oder an durch PCR Amplifikation gewonnener Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 mit einem Standard.

[0032] Weiterhin umfaßt die Erfindung ein Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis eines Proteins gemäß Anspruch 1 in einer biologischen Probe, das folgende Schritte umfaßt:

a) Inkubation einer biologischen Probe mit einem Antikörper, der spezifisch gegen das Protein gemäß Anspruch 1 gerichtet ist,

d) Nachweis des Antikörper/Antigenkomplexes,

c) Vergleich der Mengen des Antikörper/Antigenkomplexes mit einem Standard.

[0033] Als Standard können biologische Proben wie Gewebestücke, Serum oder Blut dienen, die von gesunden Probanden entnommen wurden.

#### Beispiel 1

##### Klonierung der Rezeptor cDNA

[0034] Bei der Sequenzanalyse von cDNA-Klonen einer cDNA-Bibliothek aus menschlichem Gehirn wurde zunächst eine Teilsequenz identifiziert. Die Sequenz dieses Teilkloones umfaßt den Bereich zwischen Nukleotidposition 352 und 2411 in SEQ ID NO:1.

[0035] Aus einer cDNA-Bibliothek aus menschlichem Gehirn (Human Brain 5' Stretch Plus cDNA Library, # HL5018t, Fa. Clontech, Jahr 1997) wurde die Gesamtsequenz SEQ ID NO:1 mittels geschachtelter Polymerase Chain Reaktion amplifiziert. Dazu kamen folgende Oligonukleotidprimer zur Anwendung:

PCR1: mit SEQ ID NO: 3 und SEQ ID NO: 4;

PCR2: mit SEQ ID NO: 3 und SEQ ID NO: 5.

#### Beispiel 2

##### Expression des neuen Rezeptors in menschlichen Geweben

[0036] Die Expression des neuen Rezeptors wurde in 50 verschiedenen menschlichen Geweben mittels RNA-Dot-blot-Analyse untersucht. Ein Blot der Firma Clontech (#7770-1) wurde dazu mit einer Rezeptor-Probe hybridisiert. Die Probe wurde durch *in vitro* Transkription der entsprechenden cDNA in Anwesenheit Digoxigenin-markierter Nukleotide hergestellt. Nach stringentem Waschen wurde das Transkript hauptsächlich in Gehirngewebe nachgewiesen.

## SEQUENCE LISTING

5 <110> BASF Aktiengesellschaft  
 <120> Neuer G-Protein gekoppelter Rezeptor aus menschlichem Hirn  
 10 <130> OZ 0050/48774  
 <140>  
 <141>  
 15 <150> DE 19805351.7  
 <151> 1998-02-11  
 <160> 5  
 20 <170> PatentIn Ver. 2.0  
 <210> 1  
 <211> 2411  
 <212> DNA  
 25 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> 5'UTR  
 <222> (1)..(19)  
 30 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (20)..(1462)  
 35 <220>  
 <221> 3'UTR  
 <222> (1463)..(2411)  
 40 <400> 1  
 gtctcctgct catccagcc atg cgg tgg ctg tgg ccc ctg gct gtc tct ctt 52  
 Met Arg Trp Leu Trp Pro Leu Ala Val Ser Leu  
 1 5 10  
 45 gct gtg att ttg gct gtg ggg cta agc agg gtc tct ggg ggt gcc ccc 100  
 Ala Val Ile Leu Ala Val Gly Leu Ser Arg Val Ser Gly Gly Ala Pro  
 15 20 25  
 50 ctg cac ctg ggc agg cac aga gcc gag acc cag gag cag cag agc cga 148  
 Leu His Leu Gly Arg His Arg Ala Glu Thr Gln Glu Gln Gln Ser Arg  
 30 35 40  
 55

EP 0 943 685 A2

5 tcc aag agg ggc acc gag gat gag gag gcc aag ggc gtg cag cag tat 196  
Ser Lys Arg Gly Thr Glu Asp Glu Glu Ala Lys Gly Val Gln Gln Tyr  
45 50 55

10 gtg cct gag gag tgg gcg gag tac ccc cgg ccc att cac cct gct ggc 244  
Val Pro Glu Glu Trp Ala Glu Tyr Pro Arg Pro Ile His Pro Ala Gly  
60 65 70 75

15 ctg cag cca acc aag ccc ttg gtg gcc acc agc cct aac ccc gac aag 292  
Leu Gln Pro Thr Lys Pro Leu Val Ala Thr Ser Pro Asn Pro Asp Lys  
80 85 90

20 gat ggg ggc acc cca gac agt ggg cag gaa ctg agg ggc aat ctg aca 340  
Asp Gly Gly Thr Pro Asp Ser Gly Gln Glu Leu Arg Gly Asn Leu Thr  
95 100 105

25 ggg gca cca ggg cag agg cta cag atc cag aac ccc ctg tat ccg gtg 388  
Gly Ala Pro Gly Gln Arg Leu Gln Ile Gln Asn Pro Leu Tyr Pro Val  
110 115 120

30 acc gag agc tcc tac agt gcc tat gcc atc atg ctt ctg gcg ctg gtg 436  
Thr Glu Ser Ser Tyr Ser Ala Tyr Ala Ile Met Leu Leu Ala Leu Val  
125 130 135

35 gtg ttt gcg gtg ggc att gtg ggc aac ctg tgc gtc atg tgc atc gtg 484  
Val Phe Ala Val Gly Ile Val Gly Asn Leu Ser Val Met Cys Ile Val  
140 145 150 155

40 tgg cac agc tac tac ctg aag agc gcc tgg aac tcc atc ctt gcc agc 532  
Trp His Ser Tyr Tyr Leu Lys Ser Ala Trp Asn Ser Ile Leu Ala Ser  
160 165 170

45 ctg gcc ctc tgg gat ttt ctg gtc ctc ttt ttc tgc ctc cct att gtc 580  
Leu Ala Leu Trp Asp Phe Leu Val Leu Phe Phe Cys Leu Pro Ile Val  
175 180 185

50 atc ttc aac gag atc acc aag cag agg cta ctg ggt gac gtt tct tgt 628  
Ile Phe Asn Glu Ile Thr Lys Gln Arg Leu Leu Gly Asp Val Ser Cys  
190 195 200

55 cgt gcc gtg ccc ttc atg gag gtc tcc tct ctg gga gtc acg act ttc 676  
Arg Ala Val Pro Phe Met Glu Val Ser Ser Leu Gly Val Thr Thr Phe  
205 210 215

agc ctc tgt gcc ctg ggc att gac cgc ttc cac gtg gcc acc agc acc 724  
Ser Leu Cys Ala Leu Gly Ile Asp Arg Phe His Val Ala Thr Ser Thr  
220 225 230 235

ctg ccc aag gtg agg ccc atc gag cgg tgc caa tcc atc ctg gcc aag 772

EP 0 943 685 A2

	Leu Pro Lys Val Arg Pro Ile Glu Arg Cys Gln Ser Ile Leu Ala Lys	
	240 245 250	
5	ttg gct gtc atc tgg gtg ggc tcc atg acg ctg gct gtg cct gag ctc Leu Ala Val Ile Trp Val Gly Ser Met Thr Leu Ala Val Pro Glu Leu	820
	255 260 265	
10	ctg ctg tgg cag ctg gca cag gag cct gcc ccc acc atg ggc acc ctg Leu Leu Trp Gln Leu Ala Gln Glu Pro Ala Pro Thr Met Gly Thr Leu	868
	270 275 280	
15	gac tca tgc atc atg aaa ccc tca gcc agc ctg ecc gag tcc ctg tat Asp Ser Cys Ile Met Lys Pro Ser Ala Ser Leu Pro Glu Ser Leu Tyr	916
	285 290 295	
20	tca ctg gtg atg acc tac cag aac gcc cgc atg tgg tgg tac ttt ggc Ser Leu Val Met Thr Tyr Gln Asn Ala Arg Met Trp Trp Tyr Phe Gly	964
	300 305 310 315	
25	tgc tac ttc tgc ctg ccc atc ctc ttc aca gtc acc tgc cag ctg gtg Cys Tyr Phe Cys Leu Pro Ile Leu Phe Thr Val Thr Cys Gln Leu Val	1012
	320 325 330	
30	aca tgg cgg gtg cga ggc cct cca ggg agg aag tca gag tgc agg gcc Thr Trp Arg Val Arg Gly Pro Pro Gly Arg Lys Ser Glu Cys Arg Ala	1060
	335 340 345	
35	agc aag cac gag cag tgt gag agc cag ctc aac agc acc gtg gtg ggc Ser Lys His Glu Gln Cys Glu Ser Gln Leu Asn Ser Thr Val Val Gly	1108
	350 355 360	
40	ctg acc gtg gtc tac gcc ttc tgc acc ctc cca gag aac gtc tgc aac Leu Thr Val Val Tyr Ala Phe Cys Thr Leu Pro Glu Asn Val Cys Asn	1156
	365 370 375	
45	atc gtg gtg gcc tac ctc tcc acc gag ctg acc cgc cag acc ctg gac Ile Val Val Ala Tyr Leu Ser Thr Glu Leu Thr Arg Gln Thr Leu Asp	1204
	380 385 390 395	
50	ctc ctg ggc ctc atc aac cag ttc tcc acc ttc ttc aag ggc gcc atc Leu Leu Gly Leu Ile Asn Gln Phe Ser Thr Phe Phe Lys Gly Ala Ile	1252
	400 405 410	
55	acc cca gtg ctg ctc ctt tgc atc tgc agg ccg ctg ggc cag gcc ttc Thr Pro Val Leu Leu Leu Cys Ile Cys Arg Pro Leu Gly Gln Ala Phe	1300
	415 420 425	
60	ctg gac tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc gag gag tgc ggc ggc gct tgc Leu Asp Cys Cys Cys Cys Cys Cys Cys Glu Glu Cys Gly Gly Ala Ser	1348

EP 0 943 685 A2

430 435 440

5 gag gcc tct gct gcc aat ggg tgg gac aac aag ctc aag acc gag gtg 1396  
 Glu Ala Ser Ala Ala Asn Gly Ser Asp Asn Lys Leu Lys Thr Glu Val  
 445 450 455

10 tcc tct tcc atc tac ttc cac aag ccc agg gag tca ccc cca ctc ctg 1444  
 Ser Ser Ser Ile Tyr Phe His Lys Pro Arg Glu Ser Pro Pro Leu Leu  
 460 465 470 475

15 ccc ctg ggc aca cct tgc tgaggcccca gtaggggtgg ggaggaggagg 1492  
 Pro Leu Gly Thr Pro Cys  
 480

20 agaggccgcc acccccgcgg gtgtctgctg ttctttcccc ataggtcttg ctttgttgcc 1552  
 tgtcttgctg tctagggatg gacttggttc ctcttgtaaa gggttgaggaa tgtcaaagcc 1612

25 ccctccccac acagggcctt tctgtccct tgtggggcct tccaacctg tctttccac 1672  
 tgggtgggcgg tgatgcttct aggtccttag aactgccag aaactctgag tcccagcagc 1732  
 tgggagccag aactttgcct gccctccctt ggtccagtc tctcttctct ctctctgctt 1792

30 tggaaactga ccatacttta gttgtgccct tcccaggcat catcctocta ccaccaacct 1852  
 ggggccccat cttggaatgg gggctccttg gggccagccc agtgtggctc accacactct 1912  
 tctttttttt tttttttttt gagatggagt cttgctctgt tgcccaggct ggagtacatt 1972

35 tgctgatgt cagctccctg caacctcgc ctctggggt caagcgattc tctgcctca 2032  
 gctcctgag tagctgggat tacagggtgtg caccaacaca cccggctaatt tttgtattt 2092  
 gtagaagagg cgggggtttca ccatgttggc caggctgggt ttgaactcct gacctcaagt 2152

40 gatctgctg ccttggcctc ccaaagtgt gggattacag gtgtgagctg ccacgccag 2212  
 cccagtaga ctcttctctg gaccagatct gtcccagtc tggatgcctc ctctactgg 2272  
 tgctttttt tcttcagag gatttctctc tcttctctc tctttttt gggatccctg 2332

45 ggttgccctg tccaacctc cttgttaggt gctttcccat aggaggcct tcttgagaaa 2392  
 caataaacta ggtagaact 2411

50

<210> 2  
 <211> 481

55



EP 0 943 685 A2

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

5 <400> 2  
Met Arg Trp Leu Trp Pro Leu Ala Val Ser Leu Ala Val Ile Leu Ala  
1 5 10 15  
10 Val Gly Leu Ser Arg Val Ser Gly Gly Ala Pro Leu His Leu Gly Arg  
20 25 30  
His Arg Ala Glu Thr Gln Glu Gln Gln Ser Arg Ser Lys Arg Gly Thr  
35 40 45  
15 Glu Asp Glu Glu Ala Lys Gly Val Gln Gln Tyr Val Pro Glu Glu Trp  
50 55 60  
20 Ala Glu Tyr Pro Arg Pro Ile His Pro Ala Gly Leu Gln Pro Thr Lys  
65 70 75 80  
Pro Leu Val Ala Thr Ser Pro Asn Pro Asp Lys Asp Gly Gly Thr Pro  
85 90 95  
25 Asp Ser Gly Gln Glu Leu Arg Gly Asn Leu Thr Gly Ala Pro Gly Gln  
100 105 110  
30 Arg Leu Gln Ile Gln Asn Pro Leu Tyr Pro Val Thr Glu Ser Ser Tyr  
115 120 125  
Ser Ala Tyr Ala Ile Met Leu Leu Ala Leu Val Val Phe Ala Val Gly  
130 135 140  
35 Ile Val Gly Asn Leu Ser Val Met Cys Ile Val Trp His Ser Tyr Tyr  
145 150 155 160  
Leu Lys Ser Ala Trp Asn Ser Ile Leu Ala Ser Leu Ala Leu Trp Asp  
165 170 175  
40 Phe Leu Val Leu Phe Phe Cys Leu Pro Ile Val Ile Phe Asn Glu Ile  
180 185 190  
Thr Lys Gln Arg Leu Leu Gly Asp Val Ser Cys Arg Ala Val Pro Phe  
195 200 205  
45 Met Glu Val Ser Ser Leu Gly Val Thr Thr Phe Ser Leu Cys Ala Leu  
210 215 220  
50 Gly Ile Asp Arg Phe His Val Ala Thr Ser Thr Leu Pro Lys Val Arg  
225 230 235 240  
55

EP 0 943 685 A2

Pro Ile Glu Arg Cys Gln Ser Ile Leu Ala Lys Leu Ala Val Ile Trp  
245 250 255

5 Val Gly Ser Met Thr Leu Ala Val Pro Glu Leu Leu Leu Trp Gln Leu  
260 265 270

Ala Gln Glu Pro Ala Pro Thr Met Gly Thr Leu Asp Ser Cys Ile Met  
10 275 280 285

Lys Pro Ser Ala Ser Leu Pro Glu Ser Leu Tyr Ser Leu Val Met Thr  
290 295 300

15 Tyr Gln Asn Ala Arg Met Trp Trp Tyr Phe Gly Cys Tyr Phe Cys Leu  
305 310 315 320

Pro Ile Leu Phe Thr Val Thr Cys Gln Leu Val Thr Trp Arg Val Arg  
20 325 330 335

Gly Pro Pro Gly Arg Lys Ser Glu Cys Arg Ala Ser Lys His Glu Gln  
340 345 350

25 Cys Glu Ser Gln Leu Asn Ser Thr Val Val Gly Leu Thr Val Val Tyr  
355 360 365

Ala Phe Cys Thr Leu Pro Glu Asn Val Cys Asn Ile Val Val Ala Tyr  
30 370 375 380

Leu Ser Thr Glu Leu Thr Arg Gln Thr Leu Asp Leu Leu Gly Leu Ile  
385 390 395 400

35 Asn Gln Phe Ser Thr Phe Phe Lys Gly Ala Ile Thr Pro Val Leu Leu  
405 410 415

Leu Cys Ile Cys Arg Pro Leu Gly Gln Ala Phe Leu Asp Cys Cys Cys  
40 420 425 430

Cys Cys Cys Cys Glu Glu Cys Gly Gly Ala Ser Glu Ala Ser Ala Ala  
435 440 445

45 Asn Gly Ser Asp Asn Lys Leu Lys Thr Glu Val Ser Ser Ser Ile Tyr  
450 455 460

Phe His Lys Pro Arg Glu Ser Pro Pro Leu Leu Pro Leu Gly Thr Pro  
50 465 470 475 480

Cys

55

```

35
5
    <210> 3
    <211> 26
    <212> DNA
    <213> Homo sapiens

    <400> 3
    ctcgggaagc ggcgcattgt gttggt
10
    26

    <210> 4
    <211> 26
    <212> DNA
    <213> Homo sapiens
15
    <400> 4
    gagccacccc agatgacagc caactt
20
    26

    <210> 5
    <211> 26
    <212> DNA
    <213> Homo sapiens
25
    <400> 5
    tgaagggcac ggcacgacaa gaaacg
30
    26
35

```

## Patentansprüche

1. Isoliertes Protein, enthaltend die in SEQ ID NO:2 dargestellte Aminosäuresequenz oder eine daraus durch Substitution, Insertion oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäureresten erhaltene Sequenz, wobei wenigstens noch eine der wesentlichen biologischen Eigenschaften des in SEQ ID NO:2 dargestellten Proteins erhalten bleibt.
2. Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um ein humanes Protein handelt.
3. Nukleinsäuresequenz codierend für ein Protein nach Anspruch 1.
4. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein Protein codiert, das wenigstens 60 % Identität mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Sequenz hat.
5. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in SEQ ID NO:1 dargestellte Sequenz enthält.
6. Rekombinantes Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 3 funktionell verknüpft mit mindestens einem genetischen Regulationselement.
7. Wirtsorganismus, transformiert mit einer Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 3.
8. Wirtsorganismus, transformiert mit einem rekombinanten Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 6.

9. Verwendung eines Proteins nach Anspruch 1 als Antigen zur Erzeugung von spezifischen Antikörpern.

10. Antikörper, die spezifisch das Protein nach Anspruch 1 erkennen.

5 11. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz zur Gentherapie.

12. Verwendung einer zu der Sequenz gemäß Anspruch 3 komplementären Nukleinsäuresequenz zur Gentherapie.

10 13. Verfahren zur Identifizierung von Antagonisten und Agonisten für das Protein gemäß Anspruch 1 indem man Zellen, die das Protein gemäß Anspruch 1 auf der Zelloberfläche tragen mit einer Vielzahl zu untersuchender Substanzen (Testsubstanzen) zusammenbringt, und anschließend die biologische Aktivität des Rezeptors in An- und Abwesenheit der Testsubstanz vergleicht.

15 14. Verfahren zum Testen von Substanzen hinsichtlich ihrer Eigenschaft als Ligand für das Protein gemäß Anspruch 1 zu fungieren, das folgende Schritte umfaßt:

a) Expression des Proteins nach Anspruch 1 in eukaryontischen Zellen,

20 b) Inkubation dieser Zellen mit Proteinextrakten, bevorzugt aus Gehirngewebe stammend,

c) Ermittlung der Bindung der zu untersuchenden Substanz an das Protein gemäß Anspruch 1 und der Aktivierung durch Messung der cAMP Konzentration oder des Calciumflusses in der Zelle.

25 15. Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis einer Nukleinsäure nach Anspruch 3 in einer biologischen Probe, das folgende Schritte umfaßt:

30 a) Inkubation einer biologischen Probe mit einer bekannten Menge an Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 oder einer bekannten Menge an Oligonukleotiden, die als Primer für eine Amplifikation der Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 geeignet sind,

b) Nachweis der Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 durch spezifische Hybridisierung oder PCR-Amplifikation,

35 c) Vergleich der Menge an hybridisierender Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 oder an durch PCR Amplifikation gewonnener Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 mit einem Standard.

40 16. Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis eines Proteins gemäß Anspruch 1 in einer biologischen Probe, das folgende Schritte umfaßt:

a) Inkubation einer biologischen Probe mit einem Antikörper, der spezifisch gegen das Protein gemäß Anspruch 1 gerichtet ist,

45 b) Nachweis des Antikörper/Antigenkomplexes,

c) Vergleich der Mengen des Antikörper/Antigenkomplexes mit einem Standard.

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

**EP 0 943 685 A3**

(12)

**EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(88) Veröffentlichungstag A3:  
16.08.2000 Patentblatt 2000/33

(43) Veröffentlichungstag A2:  
22.09.1999 Patentblatt 1999/38

(21) Anmeldenummer: 99101164.4

(22) Anmeldetag: 22.01.1999

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: C12N 15/12, C07K 14/705,  
C07K 16/28, A61K 48/00,  
C12Q 1/68, G01N 33/576,  
G01N 33/68, C12N 5/10

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 11.02.1998 DE 19805351

(71) Anmelder:  
BASF AKTIENGESELLSCHAFT  
67056 Ludwigshafen (DE)

(72) Erfinder:  
• Kröger, Burkhard, Dr.  
67117 Limburgerhof (DE)  
• Otterbach, Bernd, Dr.  
67061 Ludwigshafen (DE)

(54) **Neuer G-Protein-gekoppelter Rezeptor aus menschlichem Gehirn**

(57) Neuer G-Protein gekoppelter Rezeptor aus  
menschlichem Gehirn, das dafür codierendes Gen und  
seine Verwendung

**EP 0 943 685 A3**


**Europäisches EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT**
**Patentamt**

 der nach Regel 45 des Europäischen Patent-  
 Übereinkommens für das weitere Verfahren als  
 europäischer Recherchenbericht gilt

Nummer der Anmeldung

EP 99 10 1164

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
P,X	EP 0 845 529 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 3. Juni 1998 (1998-06-03) * Abbildung 1 * * Seite 14, Zeile 28 - Zeile 30 * * Ansprüche 1,12,18 *	1-16	C12N15/12 C07K14/705 C07K16/28 A61K48/00 C12Q1/68 G01N33/576 G01N33/68 C12N5/10
P,X	VALDENAIRE, O. ET AL.: "A new family of orphan G protein-coupled receptors predominantly expressed in the brain." FEBS LETTERS, Bd. 424, 13. März 1998 (1998-03-13), Seiten 193-196, XP002140114 * Seite 194; Abbildung 1A *	1-10, 14, 15	
A	MEYERHOF W ET AL: "CLONING OF A CDNA ENCODING A NOVEL PUTATIVE G-PROTEIN-COUPLED RECEPTOR EXPRESSED IN SPECIFIC RAT BRAIN REGIONS" DNA AND CELL BIOLOGY, US, NEW YORK, NY, Bd. 10, 1. November 1991 (1991-11-01), Seiten 689-694, XP000612837 ISSN: 1044-5498 * Seite 690, Spalte 1, Absatz 2 *	1-10, 13-15	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
			C12N C07K C12Q G01N
<b>UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE</b>			
<p>Die Recherchenabteilung ist der Auffassung, daß ein oder mehrere Ansprüche, den Vorschriften des EPÜ in einem solchen Umfang nicht entspricht bzw. entsprechen, daß einwellige Ermittlungen über den Stand der Technik für diese Ansprüche nicht, bzw. nur teilweise, möglich sind.</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Unvollständig recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Nicht recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Grund für die Beschränkung der Recherche:</p> <p>Obwohl die Ansprüche 11 und 12 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen (Artikel 52(4) EPÜ), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.</p>			
Recherchenort		Abschlußdatum der Recherche	
DEN HAAG		14. Juni 2000	
		Prüfer	
		Mata-Vicente, M	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN			
<p>X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet</p> <p>Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie</p> <p>A: technologischer Hintergrund</p> <p>O: mündliche Offenbarung</p> <p>P: Zwischenliteratur</p> <p>T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</p> <p>E: älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>D: in der Anmeldung angeführtes Dokument</p> <p>L: aus anderen Gründen angeführtes Dokument</p> <p>Δ: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			



Europäisches  
Patentamt

EUROPÄISCHER  
TEILRECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 99 10 1164

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (IntCl.8)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	
A	<p>HATA, S. ET AL.: "cDNA cloning of a putative G protein-coupled receptor from brain."</p> <p>BIOCHIM. ET BIOPHYS. ACTA, Bd. 1261, 1995, Seiten 121-125, XP000914574</p> <p>* Zusammenfassung *</p> <p>-----</p>	1-10,15	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (IntCl.8)

EPO FORM 1503 03.03 (7/94C12)

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 99 10 1164

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.  
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

14-06-2000

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0845529 A	03-06-1998	JP 10127289 A	19-05-1998
		US 6048711 A	11-04-2000
-----			

EPO FORM P0481

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82